

## カエル骨格筋における疲労の機序について

金 谷 秀 秋

札幌医科大学訪問研究員 (北海道教育大学)

高 氏 昌 永井寅男

札幌医科大学生理学第1講座 (主任 永井寅男教授)

### On the Mechanism of Fatigue in Frog Skeletal Muscle

Hideaki KANAYA

*Visiting Research Fellow (Hokkaido Univ. of Education)*

Masa TAKAUJI and Torao NAGAI

*Department of Physiology (Section 1) Sapporo Medical College*

*(Chief: Prof. T. Nagai)*

The changes of membrane potential, duration of active state and potassium contracture by repetitive stimulation were examined, using single twitch fibers dissected from frog semitendinosus muscle. Caffeine contracture in the fatigued fiber and the recovery process from the inhibition of potassium contracture with fatigue were also examined. The results obtained were as follows:

- 1) The twitch tension in a single fiber was first potentiated by repetitive stimulation at 2/sec, and then decreased gradually, and was inhibited almost completely after 20 min of the repetitive stimulation.
- 2) The resting and action potentials were changed with the increasing period of stimulating time but the changes were not remarkable.
- 3) The peak tension of caffeine contracture in fatigued fiber was 75% of control tension and the rate of rise of the contracture was slightly inhibited.
- 4) The activation curve of potassium contracture obtained at complete fatigue shifted toward the right and downward: The threshold for potassium contracture shifted by about 20 mM  $K^+$  as compared with control, and the inhibition of peak tension at each potassium concentration was about 45%. It was also observed that the threshold shifted by about 10 mM  $K^+$  toward the right at the stage of positive staircase.
- 5) The time dependence curve of the inhibition of the potassium contracture induced by 190 mM  $K^+$  was monophasic and almost exponential. The rate of the inhibition was accelerated at 0.18 mM  $Ca^{++}$  and this acceleration was more pronounced in the absence of  $Ca^{++}$ .
- 6) The peak contracture tension induced by 190 mM  $K^+$  was inhibited by repetitive stimulation and the inhibition was recovered slowly after termination of the stimulation, but the recovery was incomplete after a period of rest of 60 min.
- 7) The durations of the active state at the stage of staircase and of almost complete fatigue were prolonged by 1.4 times and more than twice as compared with control, respectively.

On the basis of these results, it was discussed that the cause of fatigue in muscle is the excitation-contraction uncoupling and fatigue sets in by some process which differs from that of inactivation of potassium contracture.

(Received March 11, 1980 and accepted May 26, 1980)

#### 1 緒 言

骨格筋の疲労現象に関しては、従来多くの報告<sup>1~7)</sup>がある。Mashima *et al.*, Eberstein and Sandow<sup>2)</sup>, 北ら<sup>3)</sup>および Grabowski *et al.*<sup>4)</sup>によれば、ほぼ完全に疲労した筋

においても活動電位の amplitude ならびに shape には著明な変化はなく、またこの条件下に caffeine 拘縮<sup>2,8)</sup>や、 $K$  拘縮<sup>2~4)</sup>が起ることから、筋疲労の原因は興奮収縮連関 (excitation-contraction coupling; E-C coupling) の遮断によると考えられている。しかし、その遮断される

部位や遮断の機序などの詳細については、現在なお明らかにされていない。Grabowski *et al.*<sup>4)</sup>は、疲労はK拘縮のinactivationに影響を与えないと報告しているが、この点についてもなお検討の余地があるように思われる。以上のように、筋疲労の原因あるいは発現機序に関してはなお多くの問題が残されており、これらを明らかにすることは、同時に筋におけるE-C coupling機構の解明にも役立つと考えられる。

われわれは本実験において、カエルのsingle twitch muscle fiberを用い、疲労にいたる時間経過(疲労曲線)と平行して、その膜電位変化ならびに、tetanusおよびK拘縮の発生張力の変化を検討した。また、疲労筋のcaffeine拘縮についても精査し、さらに疲労に伴うK拘縮の抑制からの回復につき、その時間経過を検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 摘出筋標本

カエル(*Rana japonica*)の半腱様筋(m. semitendinosus)から分離した単一筋線維(single twitch muscle fiber)を使用した。

### 2.2 機械的応答の記録

分離したsingle fiberの腱の一端をガラス製の鉤に、他端をstrain gauge(SB-1T-H, 日本光電工業社製)のフックに化学接着剤(アロンアルファ, 東亜合成化学社製)で付着固定させ、これを容積0.8 mlの液槽中に浸漬させ実験を行なった。筋線維は静止長の1.2倍に伸展された。筋の機械的応答はインク書きオシログラフ(WI-260, 日本光電工業社製)上に記録した。

### 2.3 電気刺激

電子管刺激装置(MSE-2, 日本光電工業社製)を用い、刺激強度が最大で持続時間0.5 msecの矩形波刺激をアイソレータ(MSE-JM, 日本光電工業社製)を介して標本に与えた。刺激電極には、白金板からなるmassive electrodeを用い、筋線維の長軸と平行に配列した。連続刺激における刺激頻度は、2回/秒(2Hz)とした。

### 2.4 活動電位の記録

これには、3 M KClを充填した電気抵抗10~20 MΩの細胞内微細電極を用いた。細胞内微細電極からの電気信号は、微細電極用増幅器(MEZ-7101, 日本光電工業社製)により増幅され、ブラウン管オシロスコープ(VC-9, 日本光電工業社製)および連続撮影装置(PC-1B, 日本光電工業社製)により記録された。

電気刺激は、前記の方法<sup>2,3)</sup>と同様に与えた。ただし、刺激電極には白金線からなるpoint electrodeを使用した。

なお浸漬液としては、muscle fiberの収縮を抑えるため、

正常Ringer液に250 mM(最終濃度)sucroseを含むhypertonic sucrose Ringer液を用いた。

### 2.5 Active stateの測定

Active stateのdurationはMacpherson and Wilkie<sup>9)</sup>の方法に従い、twitch curveとtetanus curveが分離するまでの時間を測定することにより求めた。Twitchおよびtetanusは、mechano-electronic transducer(RCA-5734, 東芝)を用い、ブラウン管オシログラフ(VC-9, 日本光電工業社製)に記録した。

なおtetanusの刺激頻度は200回/秒(200 Hz)であり、そのdurationは70 msecであった。

### 2.6 Activation curveの求め方

Frankenhaeuser and Lännergren<sup>10)</sup>の方法に従い、標本に190 mM K Ringer液を作用させ、この時のカリウム拘縮(以下、K拘縮)のpeak tensionを測定した後、標本を20分間正常Ringer液で洗滌した。その後各K<sup>+</sup>濃度のK-Ringer液による拘縮のpeak tensionを測定し、190 mM K拘縮のpeak tensionに対するそれらの割合をそれぞれのK<sup>+</sup>濃度の対数に対してplotした。また、staircaseならびにfatigue時点のactivation curveについては、同様の測定を行い、それら各点のpeak tensionを連続刺激前の190 mM K拘縮のそれに対する割合としてplotした。なお、この際twitchを抑えるため、連続刺激を与える前に2分間、刺激後には疲労からの回復をできる限り避けるために15秒間だけfiberをcholine Ringer液中で前処理した。

### 2.7 試験液

a) 正常Ringer液: NaCl 110 mM, KCl 2.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mMとし10 mM Tris-HCl bufferによりpH 7.0~7.2に調製した。

b) Caffeine Ringer液: 正常Ringer液にcaffeineを最終濃度が7 mMになるように加えた。

c) Choline Ringer液: 正常Ringer液中のNaCl 110 mM全部をcholine chlorideと置換した。

d) 各種K-Ringer液: choline Ringer液中のcholine chlorideを、各K<sup>+</sup>濃度に必要なだけKClで置換し調製した。なお190 mM K-Ringerは、95 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8 mM CaSO<sub>4</sub>および5 mM (Tris)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(pH 7.0)により調製した。

e) 各種Ca-Ringer液: 正常Ringer液中のCaCl<sub>2</sub>を除く(Ca-free)か、または0.18 mM CaCl<sub>2</sub>になるように調製した。

なお、実験は昭和53年6月から54年3月にわたり、液温20~24°C下で行った。

### 3 実験成績

#### 3.1 Single fiber における疲労曲線

カエルの半腱様筋から分離した single fiber に 2 Hz の連続刺激を与えると, twitch tension は時間の経過とともに変化し, 結果として Fig. 1 に示すような疲労曲線 (fatigue curve) が得られた. Twitch tension は初期に一旦

増強され (positive staircase), 約 3 分後に maximum (initial tension の約 2 倍) に達した. その後 tension は次第に減少し (negative staircase), 約 20 分後には initial tension の約 10% に抑制された (fatigue).

以下の実験では, このような fatigue 発現過程における muscle fiber の膜電位, tetanus, caffeine 拘縮および K 拘縮の変化を検討した.

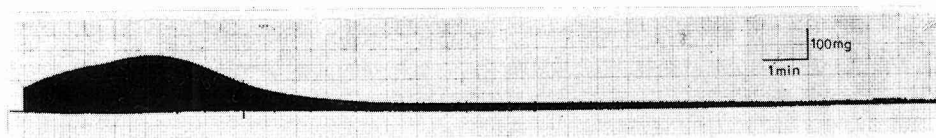


Fig. 1 Fatigue curve obtained in frog single twitch muscle fiber. Frequency of stimulation, 2/sec. Fiber diameter, 85  $\mu$ m. Temperature, 20°C.

#### 3.2 膜電位に対する連続刺激の影響

Fatigue curve と対応させて single fiber につき膜電位の変化を検討した (Fig. 2 参照). 連続刺激を与える前の single fiber の静止電位は  $-94.3 \pm 1.7$  mV (mean  $\pm$  S. E.,  $n=6$ , 以下同様) であり, また, 活動電位の overshoot, duration, negative after-potential の大きさは, それぞれ  $29.3 \pm 1.8$  mV,  $2.32 \pm 0.23$  msec および  $21.8 \pm 0.7$  mV であった (Fig. 2 A 参照). これに対し, 2 Hz の連続刺激を 1 分, 2 分, 5 分および 10 分間与えた場合 (Fig. 2, B-E 参照), 静止電位はそれぞれ  $-91.5 \pm 1.7$  mV,  $-90.7 \pm 1.8$  mV,  $-85.5 \pm 1.9$  mV および  $-80.8 \pm 2.9$  mV と徐々に減少する傾向があった. また, overshoot も連続刺激の経過とともに減少し, 10 分後には刺激前の値, すなわち  $29.3 \pm 1.8$  mV から  $9.2 \pm 2.1$  mV に減少した. さらに, 活動電位の duration も連続刺激の持続時間に依存して延長し, 10 分後では刺激前のそれ ( $2.32 \pm 0.23$  msec) の 1.9 倍 ( $4.50 \pm 0.68$  msec) になった. Negative after-potential の大きさは刺激後 1~2 分ではほとんど変らなかったが, 5 分後で  $28.2 \pm 2.2$  mV, 10 分後では  $29.3 \pm 2.4$  mV となり, 刺激前のそれ ( $21.8 \pm 0.7$  mV) より増加することが認められた. なお, この場合, 10 分間の連続刺激により twitch tension は control の 10~15% 以下あるいは完全に抑制されることが認められた. さらに, 10 分間の連続刺激による静止電位の変化, および活動電位の overshoot, duration ならびに negative after-potential の変化は, いずれも刺激停止後 5~10 分から回復し始め, 20 分後にはほぼ完全に回復した (Fig. 2 F and G 参照). なお, 本実験において, 活動電位の duration は  $-40$  mV のレベルで, また negative after-potential は活動電位の頂点から 7 msec の時点で測定した.

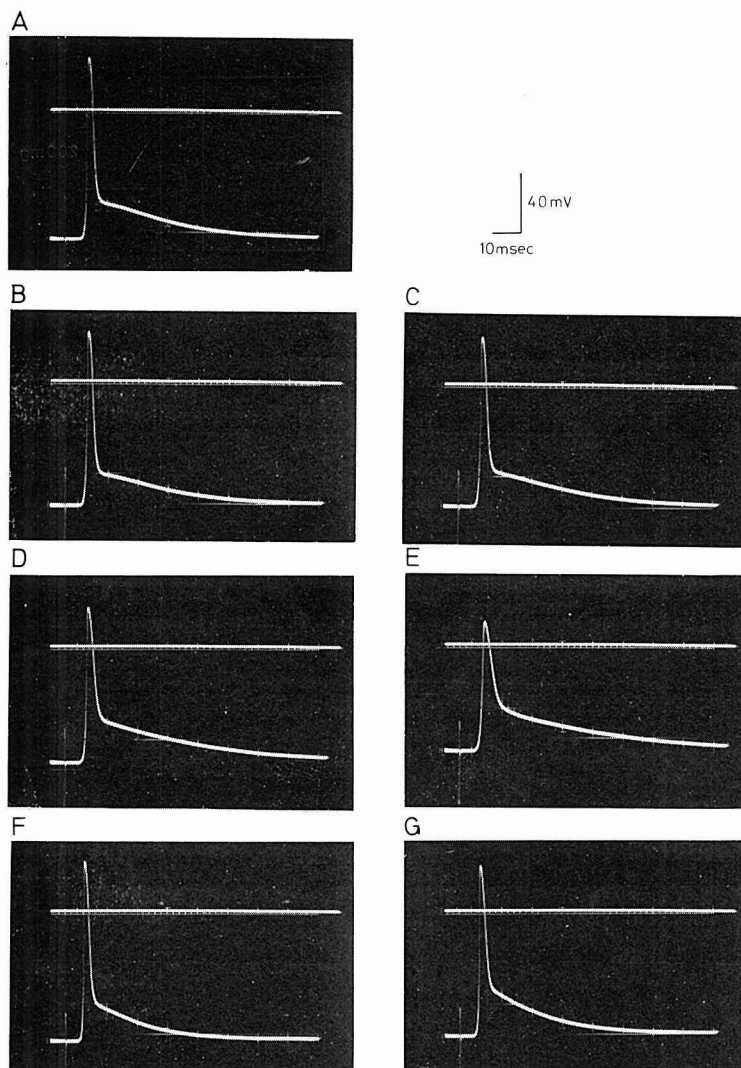
#### 3.3 Complete fatigue 下の caffeine 拘縮

Figure 3 は, 2 Hz の連続刺激により完全に疲労した single fiber における caffeine 拘縮を示す. 7 mM caffeine による拘縮の peak tension は, 刺激前では 190 mM K による拘縮 (190 mM K 拘縮) のその約 75% であり (Fig. 3 A and B), これは, 7 mM caffeine による拘縮の peak tension が 190 mM K 拘縮のその約 70% であるという Nagai *et al.*<sup>11)</sup> の報告と一致する. この caffeine 拘縮のあと muscle fiber は正常 Ringer 液で十分に (約 60 分) 洗滌された. その後連続刺激を与えることにより, 完全に疲労が起こった時点で (Fig. 3 C) 7 mM caffeine を与えると, 拘縮が起こったが (Fig. 3 D), その peak tension は刺激前のその約 75% であり, また, tension 発生速度はやや低下した. このわずかに抑制された caffeine 拘縮の peak tension は, fiber を 2 時間洗滌し休息させることにより, 刺激前のその約 90% まで回復した. なお, fatigued fiber における caffeine 拘縮については再現性が認められ, その発生 tension は control の  $72.8 \pm 4.9\%$  (mean  $\pm$  S. E.,  $n=5$ ) であった.

#### 3.4 K 拘縮の activation curve に対する連続刺激の影響

刺激を与えない場合の K 拘縮の activation curve (control curve) において (Fig. 4), その threshold ならびに half activation (50% activation) を示す K 濃度は, それぞれ約 20 mM および 40 mM であった. この成績は, 従来の報告<sup>12~14)</sup> と一致する.

2 Hz の連続刺激による positive staircase 時点で, 各種 K 濃度により発生した拘縮から得られた activation curve は, control curve に対し全体的に右かつ下方へずれた. すなわち, threshold K 濃度は control の約 20 mM から 30 mM にずれ, half activation を示す K 濃度も control の約 40 mM から 70 mM に移動した. また,



**Fig. 2** Effect of repetitive stimulation on resting and action potentials of single fiber. A: before stimulation. B, C, D and E: immediately after stimulation at 2/sec for 1, 2, 5 and 10 min, respectively. F and G: after a period of rest of 10 and 20 min. All action potentials from same fiber (diameter, 90  $\mu$ m). Temperature, 23°C.

下方へのずれ(抑制)は低K濃度側で比較的大きかった。また、190 mM K 下で約20%抑制された事実は、positive staircase 時点で twitch tension が増強されているにもかかわらず、K 拘縮が抑制されるという点で注目される。

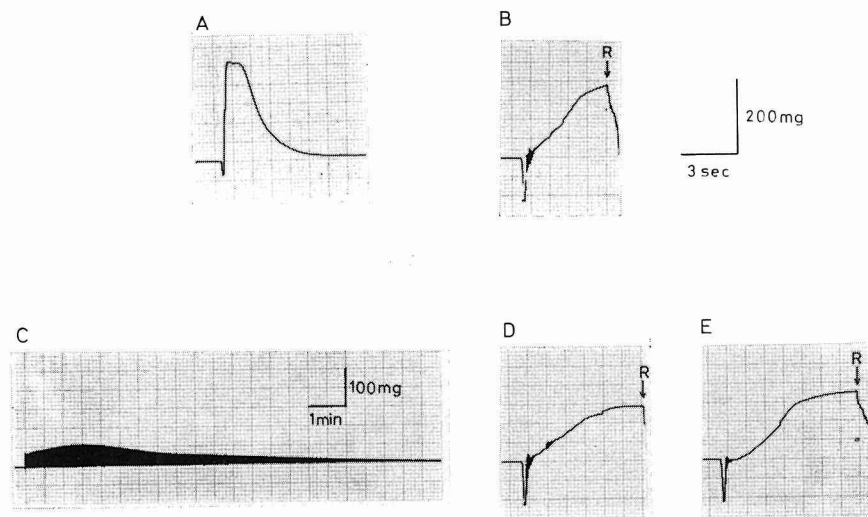
Complete fatigue 時の activation curve はさらに右方へ、かつ下方へはほぼ平行にずれ、threshold および half activation を示す K 濃度はそれぞれ 40 mM および約 110 mM となった。この成績は、同様の条件下で threshold が 20 mM から 40 mM に移動するという Grabowski *et al.*<sup>4)</sup> の報告とほぼ一致する。しかし、ほぼ完全疲労後でも K

拘縮はほとんど抑制されないという Eberstein and Sandoz<sup>2)</sup> のそれとは異なる。

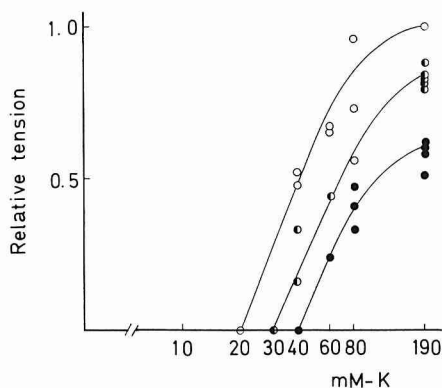
なお、control および fatigued fiber において、190 mM K Ringer 液中で示される膜電位は +1~+6 mV であり、両者の間には差は認められなかった。また、fatigued fiber の 190 mM K 拘縮において、その plateau は短縮し、spontaneous relaxation は促進されることも認められた。この点は Grabowski *et al.*<sup>4)</sup> の報告と同様である。

### 3・5 Fatigue curve と K 拘縮の抑制の時間経過

Figure 5 には、fatigue curve とそれに伴う 190 mM K



**Fig. 3** Caffeine contracture of fatigued muscle fiber. A: 190 mM  $K^+$ -contracture; B: caffeine contracture before repetitive stimulation; C: fatigue curve; D: caffeine contracture of complete fatigued fiber; E: after a period of rest of 2 hours. R: removal of caffeine. Caffeine, 7 mM. All contractures and fatigue curve from same fiber (diameter, 85  $\mu$ m). Temperature, 20.5°C.



**Fig. 4** Effect of repetitive stimulation on the activation curve of potassium contracture. Open symbol: control contractures, non stimulation. Half-filled symbol: contractures at the stage of positive staircase. Filled symbol: contractures at complete fatigue. Data points represent observations from different fibers (diameter, 75–85  $\mu$ m). Temperature, 21–24°C.

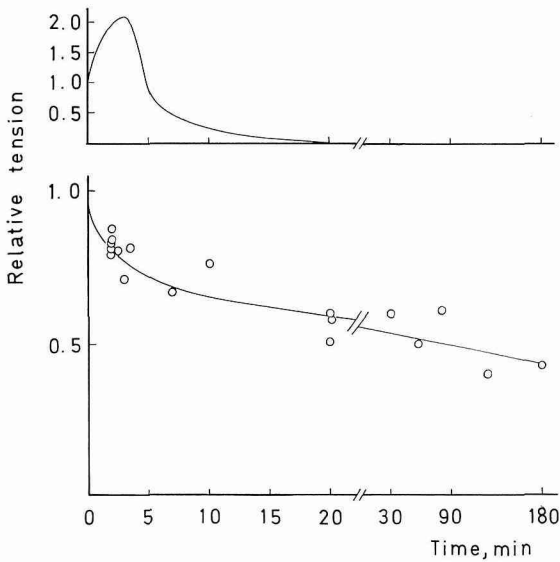
拘縮の peak tension の抑制の時間経過を示す。K 拘縮の peak tension は positive staircase 時点 (約 2 分後) ですでに約 20% 抑制され、その後時間の経過とともにほぼ exponential に減少した。しかし、complete fatigue 時

点 (20 分後) でもその peak tension の抑制は約 40% にすぎなかった。その後さらに 180 分まで刺激を続けても (twitch tension の発生はない)、なお control の 45% の K 拘縮が発生することが認められた。連続刺激によるこの K 拘縮の抑制の time dependence curve は、Nagai *et al.*<sup>15)</sup> により報告されている K 拘縮の conditioning depolarization により発現する inactivation の第 1 相 (inactivation 1) のそれに類似する。ただしその時間経過は著明に遅延している点、ならびに本実験の範囲内では、K 拘縮の inactivation の第 2 相 (inactivation 2) に相当する現象を認めることはできなかった点は注目される。

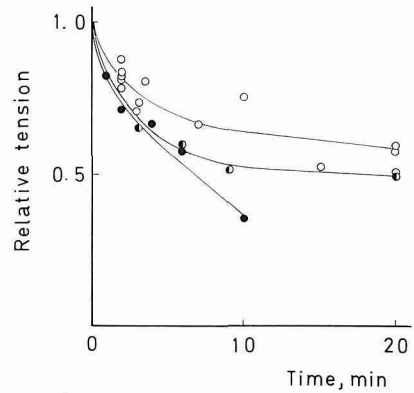
Figure 6 には、連続刺激による K 拘縮抑制の time dependence curve に対する  $Ca^{++}$  濃度の影響を示した。Ringer 液中の  $Ca^{++}$  濃度を 0.18 mM にすると抑制の rate が増し、 $Ca^{++}$  除去下ではこれがさらに顕著となった。なお、 $Ca^{++}$  除去下では complete fatigue に至るまでの時間が、1.8 mM  $Ca^{++}$  下の約 1/2~1/4 に短縮された。この成績は、fatigue 発現機構に外液の  $Ca$ -movement の変化が関与することを示唆する点で注目される。

### 3・6 疲労に伴う K 拘縮の抑制からの回復過程

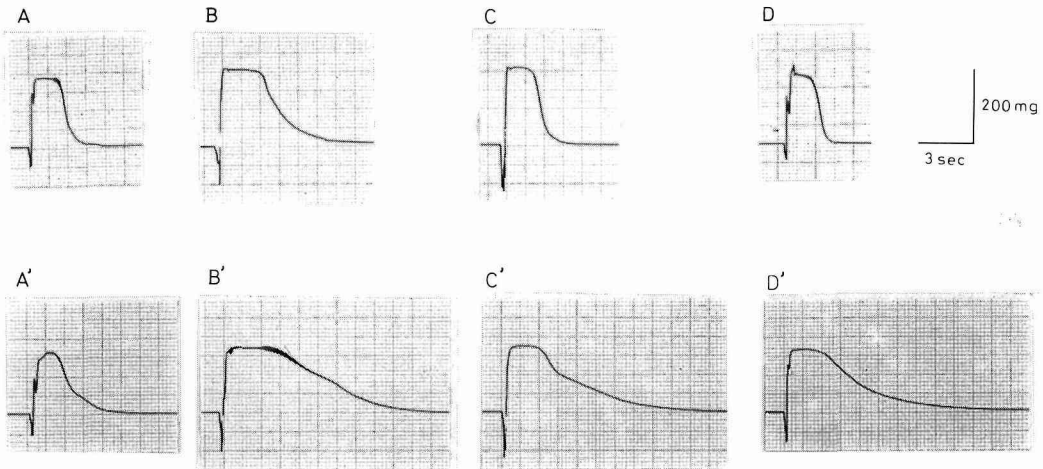
ほぼ完全に疲労した muscle fiber における前記の K 拘縮の抑制が、刺激停止によりいかに回復するかを検討した。Fig. 7 の上段は異なる 4 本の fiber における刺激前の 190 mM K 拘縮を示し、下段はほぼ完全疲労後、それぞれ 5、



**Fig. 5** Time course of the changes of twitch tension and peak contracture tension (190 mM  $K^+$ ) with repetitive stimulation at 2/sec. Upper: twitches. Lower: contractures with 190 mM  $K^+$ . Data points represent observations from different fibers (diameter, 75–85  $\mu$ m). Temperature, 21–24°C.



**Fig. 6** Effect of low calcium concentrations on the time course of the inhibition of peak contracture tension (190 mM  $K^+$ ) caused with repetitive stimulation at 2/sec. Symbols: ○, 1.8 mM  $Ca^{++}$ ; ◐, 0.18 mM  $Ca^{++}$ ; ●,  $Ca^{++}$ -free. Data points represent observations from different fibers (diameter, 70–90  $\mu$ m). Temperature, 20–24°C.



**Fig. 7** Recovery from the inhibition of 190 mM  $K^+$ -contracture induced during fatigue. Upper records: A, B, C and D: control contractures before repetitive stimulation at 2/sec. Lower records: contractures after rest; A', B', C' and D': contractures developed after a period of rest of 5, 10, 30 and 60 min after fatigue. Fiber diameter, A, 70  $\mu$ m; B, 75  $\mu$ m; C, 75  $\mu$ m; D, 70  $\mu$ m. Temperature, 20–22°C.

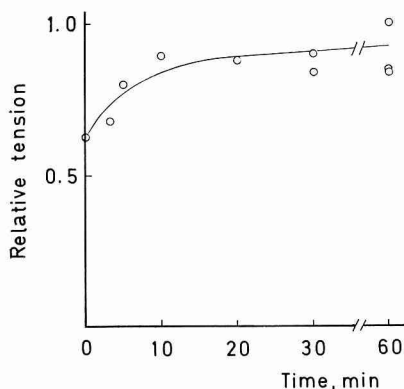


Fig. 8 Time course of recovery from the inhibition of 190 mM  $K^+$ -contracture induced during fatigue. Data points represent observations from different fibers (diameter, 70–85  $\mu$ m). Temperature, 20–22°C.

10, 30 および 60 分間休息させた後に得られた K 拘縮を示す。休息 5 分後 (A') K 拘縮の peak tension は control の約 80% まで回復し、10 分後 (B') には 85%, さらに 30 分以降 60 分 (C' and D') の間に 90% まで回復したが、この時間内では完全に回復することはなかった。また、休息後の K 拘縮において、plateau phase の延長および spontaneous relaxation の著明な遅延が認められ、しかもこれらの変化は 60 分後でもなお持続した。Fig. 8 には、これらの成績ならびに同様の他の成績における K 拘縮の peak tension の変化をまとめて plot した。これより、fatigue に伴う K 拘縮の抑制からの回復の時間経過はきわめて slow であることが示された。

### 3・7 連続刺激と active state

Figure 9 には、single fiber における staircase および twitch tension が control の約 25% に抑制された時点 (fatigue 時) での twitch と tetanus の time course を示し、この成績から active state の duration を測定した。連続刺激を与える前 (control) の active state の duration は  $7.9 \pm 0.3$  msec (mean  $\pm$  S. E.,  $n=5$ ) であり (Fig. 9A 参照), これは従来の報告<sup>16)</sup> における値とほぼ等しい。一方、2 Hz の連続刺激を 2 分間与えることにより、twitch tension が増強された時点 (staircase) では、この値が  $11.1 \pm 0.5$  msec ( $n=5$ ) となり約 1.4 倍に延長された (Fig. 9B 参照)。またこの延長は、fatigue 時ではさらに顕著となり (22.0 msec,  $n=1$ ), control の値の 2 倍以上になることが示された。なお staircase 時<sup>17–20)</sup> ならびに fatigue 時<sup>21)</sup> に active state の duration が延長することについてはすでに報告があり、本成績はそれらと一致する。

本成績において、twitch/tetanus ratio は、連続刺激

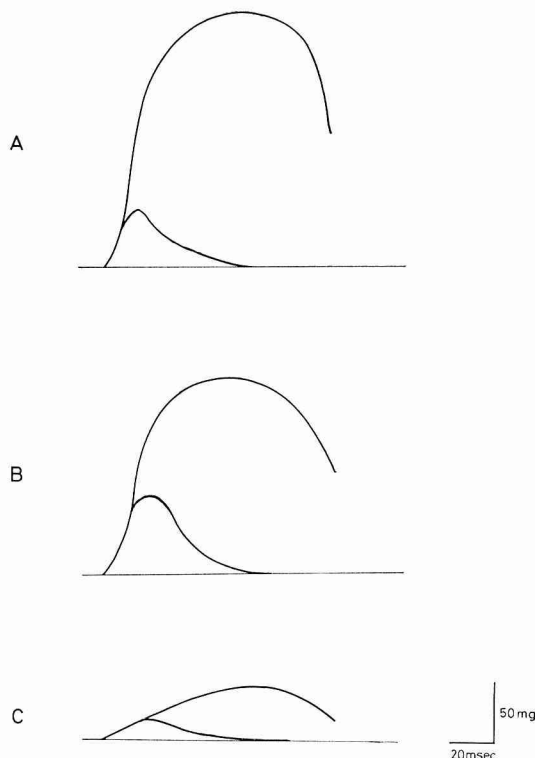


Fig. 9 Effect of repetitive stimulation on the duration of active state in single fiber. A: before repetitive stimulation; B: at the stage of positive staircase; C: at almost complete fatigue (about 25% of control tension). Fiber diameter, 80  $\mu$ m. Temperature, 22°C.

前, staircase 下および fatigue 時でそれぞれ  $0.24 \pm 0.03$  (mean  $\pm$  S. E.,  $n=5$ ),  $0.44 \pm 0.07$  ( $n=5$ ) および  $0.29$  ( $n=1$ ) であった。また, staircase 下では, tetanus tension は control の  $78.3 \pm 4.3\%$  (mean  $\pm$  S. E.,  $n=5$ ) に減少した (Fig. 9 A and B 参照) が, fatigue 時では, tetanus の抑制率は twitch のそれとほぼ同程度であった。さらに, twitch ならびに tetanus の立上り速度および弛緩速度は、いずれも連続刺激を与える時間が長くなる程抑制された (Fig. 9, A–C 参照)。

## 4 考 察

Skeletal muscle fiber において、連続刺激により twitch tension が時間の経過とともに低下して行く現象は、従来 fatigue として知られている<sup>1–4,8)</sup>。この fatigue の本質については、現在なお明らかにされていないが、少なくとも、fatigue が contraction のための energy source の枯渇によらないこと、あるいは contractile element その



ものの変化ではないことは、これまでの多くの報告<sup>1~4,8,22)</sup>により認められている。本成績において、2 Hz の連続刺激により、twitch tension が時間の経過とともに一旦増強した後、次第に減少するという周知の事実が認められた (Fig. 1) が、この変化に対応する各時点で、静止電位ならびに活動電位の大きさには著明な変化はなかった (Fig. 2)。またほぼ完全な fatigue 下で、静止電位は10数 mV の低下を示したが、活動電位の duration ならびに negative after-potential には刺激前のそれらとほとんど差はなく、また、活動電位の safety factor は十分大きいこと<sup>1,23,24)</sup> を考慮すれば、本成績における amplitude の減少は twitch の消失をきたす程ではないと考えられる (Fig. 2)。また fatigued fiber において、190 mM K により、control とほとんど等しい膜電位レベル (+1~6 mV) まで脱分極が起こった事実 (Fig. 4 に関する本文参照) も、これらの成績と符号する。さらに fatigued fiber において、caffeine 拘縮は control の 75% の tension を発生し得たことから、contractile element にも少なくとも大きな変化のないことが示された (Fig. 3)。この成績はほぼ完全に疲労した fiber でも 1.5 mM caffeine を添加すれば、control tension より大きな twitch tension を再発生し得る事実<sup>2,4)</sup>、ならびにラットの疲労筋から分離した myofibrils の ATPase 活性は、正常筋のそれと異ならない事実<sup>25)</sup> によっても支持される。したがって以上の成績から、fatigue は excitation そのもの、および contractile element そのものの変化によらず、従来の見解と同様、主として E-C coupling のある process の変化、おそらくは、excitation-Ca link (E-Ca link)<sup>26)</sup> の block によりもたらされると考えられる。

最近の Bastian and Nakajima<sup>27,28)</sup> の報告によれば、室温下に得られる活動電位は、transverse tubular system (T-system) における Na-dependent regenerative process を介する活動電位を内包すること、また、この T-system の活動電位は、control の twitch tension の約 70% に寄与するという。したがって、fatigued fiber における twitch tension の減少ないし消失が、この T-system の活動電位の障害に起因する可能性が考えられる。しかし、さらに Bastian and Nakajima<sup>27,28)</sup> によれば、T-system における活動電位の twitch tension へのこの寄与は、低温下では小さくわずか 15% であるという。このことは、fatigue は低温下では起こりにくいことを示唆する。しかし、一方、北ら<sup>3)</sup> および Grabowski *et al.*<sup>4)</sup> によれば fatigue は低温下ではむしろ著明に促進されるという。これらの事実を考慮すると、fatigued fiber における twitch tension の減少が T-system の活動電位の障害によるかも

しれないという上述の可能性は除外されなければならない。

Staircase 時およびほぼ完全疲労時の active state の duration は、それぞれ control の約 1.4 倍および約 2 倍に延長された (Fig. 9)。他方、これらの時期の tetanus tension は、それぞれ control の約 20% だけ、およびほぼ完全にまで抑制され、また 190 mM K 拘縮の peak tension もそれぞれ control の約 20%、および約 40% だけ抑制された (Figs. 5, 6 and 9)。これらの事実は、active state の intensity は連続刺激後かなり早期から徐々に減少することを示唆する。Blinks *et al.*<sup>29)</sup> は、細胞内の Ca transient の measure の一つである aequorin response の amplitude ならびに rate of decay が、連続刺激を与えることにより抑制されることから、頻回収縮の経過後においては、刺激により fiber 内に遊離する Ca 量は減少し、また、sarcoplasmic reticulum (SR) による Ca uptake の rate も低下することを示唆した。したがって、連続刺激の時間経過に伴い active state の duration が次第に増加した上の事実 (Fig. 9) は、連続刺激により twitch が頻発することにより、SR からの Ca release rate ならびに Ca uptake rate が抑制され、かつこの変化が連続刺激の持続とともに進行するために、細胞内 Ca 濃度とその条件下のあるレベルに維持される結果であるとして説明されるかもしれない。このことは、連続刺激の時間経過に伴い、twitch の rate of rise ならびに relaxation rate が減少した (Fig. 9) 事実によっても支持される。一方、同一条件下で示された active state の intensity のゆるやかな減少は、連続刺激による上述の E-C uncoupling、おそらくは E-Ca link の block に起因する SR の Ca release 機構の減弱とその進行によりもたらされると思われる。なお、staircase 時点で tetanus tension が抑制されたにもかかわらず twitch が増強された事実 (Fig. 9) は、この時点で active state の intensity が減少する反面、その duration が延長したことから、おそらく active state の intensity の減少がその duration の延長により補われたためであることが示唆される。また、tetanus tension がほとんど完全に抑制された疲労時に、190 mM K 拘縮はなお 60% の tension を発生し得ることが認められた (Figs. 5, 6 and 9)。この点は、tetanus と K 拘縮の E-C coupling 機構に一見差のあることを示唆するが、これは、K<sup>+</sup> による持続的脱分極により、より強い E-C coupling が起こるといふ Eberstein and Sandow<sup>2)</sup> の考えに従って一応説明されるかもしれない。

連続刺激により、K 拘縮の peak tension が時間の経過とともに減少していく上述の現象 (Figs. 5 and 6) は一見、閾下濃度の K<sup>+</sup> による conditioning depolarization によ



り発現する K 拘縮の inactivation<sup>30,31)</sup> の時間経過<sup>10,12)</sup> に類似する。最近, Nagai *et al.*<sup>15)</sup> は, K 拘縮の inactivation の time dependence curve が 2 相性を示すことを見出し, その第 1 相 (inactivation 1) の大きさは膜電位ならびに時間に依存し, その time course は exponential でありかつ steady level に達すること, および低濃度  $\text{Ca}^{++}$  下にその発現の程度ならびに速度が増大することなどから, squid giant axon における Na-conductance の inactivation に analogical であることを報告した。また彼らは, 第 2 相 (inactivation 2) は steady value をもたず full inactivation level に達する点で, inactivation 1 と異なる過程であると考えている。本成績において, 連続刺激に伴う K 拘縮の peak tension の抑制の time dependence curve がほぼ exponential であった (Fig. 5) こと, また, その rate が低濃度  $\text{Ca}^{++}$  あるいは  $\text{Ca}^{++}$  除去下に促進された (Fig. 6) 点は, 以上の K 拘縮の inactivation の性質に類似する。さらに, fatigued fiber における K 拘縮の activation curve が control の右かつ下方に移動した点も, inactivation により activation curve が同様のずれを示すという事実<sup>32)</sup> と類似する。また, さらに, fatigue 下の K 拘縮の time course も inactivation の促進の場合と同様, 短縮されることも示された (Fig. 4 に関する本文参照)。したがって, これらの事実は, fatigue 現象が K 拘縮の inactivation とかなり類似した機序で起こる可能性を示唆する。しかし, fatigue におけるこの time dependence curve は, K 拘縮の inactivation のそれが 2 相性を示すのに対し 1 相性であり, かつその時間経過が著明に遅延してるの点で, 両者は明らかに異なっている。他方において, K 拘縮の inactivation からの回復は, たとえ full inactivation からのそれであっても, 正常 Ringer 液中で 1 分以内にほぼ完全に回復することが知られている<sup>30,31,33,34)</sup>。これに対し, fatigue に伴う K 拘縮の抑制からの回復は, fatigue 下の K 拘縮の抑制が比較的軽度 (約 40%) であるにも拘らず, きわめてゆっくりと起こることが示された (Figs. 7 and 8)。この成績は Grabowski *et al.*<sup>4)</sup> の成績と同様である。これらの事実は, fatigue による K 拘縮の抑制と K 拘縮の inactivation によるそれとは明らかに相違することを示唆する。このことは, fatigued fiber において K 拘縮の inactivation からの recovery は intact fiber のそれと異ならないという成績にもとづき, fatigue は K 拘縮の inactivation に影響を与えないという Grabowski *et al.*<sup>4)</sup> の見解とも矛盾しない。したがって, fatigue は, K 拘縮の inactivation process とは異なる, 連続刺激によって起こされるある inhibitory process によりもたらされるものと考えられる。

## 5 結 語

カエルの半腱様筋から分離した single twitch fiber を用い, fatigue curve と対応させて膜電位, active state の duration ならびに K 拘縮の変化を検討し, また fatigued fiber の caffeine 拘縮および, fatigue に伴う K 拘縮の抑制からの回復過程についても検討した。結果は以下のごとくである。

1) 2 Hz の連続刺激により, single fiber の twitch tension は一旦増強され, その後徐々に低下し, 約 20 分後にはほぼ完全に抑制された。

2) 連続刺激により, 静止電位ならびに活動電位は刺激時間とともに変化はしたが, その変化は著明ではなかった。

3) 疲労筋の caffeine 拘縮の peak tension は正常時の約 75% であり, その立ち上り速度はやや抑制された。

4) 完全疲労時に得られた K 拘縮の activation curve は, 右方かつ下方へずれた。すなわち threshold は対照に比し K 濃度にして約 20 mM ずれ, また各 K 濃度における peak tension の抑制は, いずれも約 45% であった。

また, positive staircase 時にも threshold は約 10 mM 右にずれることが認められた。

5) 連続刺激後の 190 mM K 拘縮の抑制の time dependence curve は一相性ではほぼ exponential であった。また, この時間経過は 0.18 mM  $\text{Ca}^{++}$  下で促進され,  $\text{Ca}^{++}$  除去下でこの促進はさらに顕著となった。

6) 連続刺激により抑制された 190 mM K 拘縮の peak tension は, 刺激停止後ゆっくりと回復した。しかし, 60 分後においても完全に回復することはなかった。

7) Active state の duration は, staircase 時および fatigue 時でそれぞれ control の 1.4 倍および 2 倍以上に延長した。

以上の成績にもとづき, 疲労の原因は E-C uncoupling であり, かつ疲労は K 拘縮の inactivation と異なる process によりもたらされるであろうことを論じた。

## 文 献

1. Mashima, H., Matsumura, M. and Nakayama, Y.: On the coupling relation between action potential and mechanical response during repetitive stimulation in frog sartorius muscle. *Jpn. J. Physiol.* **12**, 324-335 (1962).
2. Eberstein, A. and Sandow, A.: Fatigue mechanisms in muscle fibres. In: Gutmann, E. and Hnik, P.: The effect of use and disuse on neuromuscular functions. 515-526, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (1963).

3. 北 進一, 永井 格, 村上俊吾: 筋疲労に関する研究. 札幌医誌 **39**, 144-155 (1971).
4. Grabowski, W., Lobsiger, E. A. and Lüttgau, H. C.: The effect of repetitive stimulation at low frequencies upon the electrical and mechanical activity of single muscle fibres. *Pflügers Arch.* **334**, 222-239 (1972).
5. Vergara, J. L., Rapoport, S. I. and Nassar-Gentina, V.: Fatigue and posttetanic potentiation in single muscle fibers of the frog. *Am. J. Physiol.* **232**, C185-C190 (1977).
6. Fitts, R. H. and Holloszy, J. O.: Effects of fatigue and recovery on contractile properties of frog muscle. *J. Appl. Physiol., Respir. Environ. Exercise Physiol.* **45**, 899-902 (1978).
7. Eisenberg, B. R. and Gilai, A.: Structural changes in single muscle fibers after stimulation at a low frequency. *J. Gen. Physiol.* **74**, 1-16 (1979).
8. 松村幹郎: カフェイン拘縮の機序. 順天堂医誌 **5**, 265-268 (1959).
9. Macpherson, L. and Wilkie, D. R.: The duration of the active state in a muscle twitch. *J. Physiol.* **124**, 292-299 (1954).
10. Frankenhaeuser, B. and Lännergren, J.: The effect of calcium on the mechanical response of single twitch muscle fibres of *Xenopus laevis*. *Acta Physiol. Scand.* **69**, 242-254 (1967).
11. Nagai, I., Oota, I. and Nagai, T.: Caffeine contracture in transverse tubules-disrupted fiber and effect of anomalous anions on the contracture in frog twitch fiber. *Jpn. J. Physiol.* **28**, 783-798 (1978).
12. 篠崎文彦, 太田 勲: カエル twitch muscle fiber の K-contracture について —mechanical activation と inactivation の関係—. 札幌医誌 **45**, 41-50 (1976).
13. Takauji, M., Takahashi, N., Suzuki, T. and Nagai, T.: Inhibitory action of dantrolene sodium on the activation of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.* **27**, 731-741 (1977).
14. Nagai, I., Oota, I. and Nagai, T.: Effect of SCN on potassium contracture in twitch muscle fibers of the frog. *Jpn. J. Physiol.* **29**, 61-73 (1979).
15. Nagai, T., Takauji, M., Kosaka, I. and Tsutsu-ura, M.: Biphasic time course of inactivation of potassium contractures in single twitch muscle fibers of the frog. *Jpn. J. Physiol.* **29**, 539-549 (1979).
16. Oota, I., Nagai, I. and Nagai, T.: Effect of SCN on twitch in single twitch muscle fibers of the frog. *Jpn. J. Physiol.* (in press).
17. Ritchie, J. M. and Wilkie, D. R.: The effect of previous stimulation on the active state of muscle. *J. Physiol.* **130**, 488-496 (1955).
18. Colomo, F. and Rocchi, P.: Staircase effect and post-tetanic potentiation in frog nerve-single muscle fibre preparations. *Archo. Fisiol.* **64**, 189-266 (1965).
19. Hanson, J. and Persson, A.: Changes in action potential and contraction of isolated frog muscle after repetitive stimulation. *Acta Physiol. Scand.* **81**, 340-348 (1971).
20. Andersson, K. E.: The effect of hypertonicity on the time course of the active state in single skeletal muscle fibres of the frog. *Acta Physiol. Scand.* **88**, 149-159 (1973).
21. Mammaerts, W. F. H. M. and Langer, G. A.: Fundamental concepts of cardiac dynamics and energetics. *Ann. Rev. Med.* **14**, 261-296 (1963).
22. Lüttgau, H. C.: Caffeine, calcium and the activation of contraction. In: Ed. by Cuthbert, A. W.: *Calcium and Cellular Function*. 241-248, Macmillan, London & Beccles (1970).
23. Sandow, A.: Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J. Biol. Med.* **25**, 176-201 (1952).
24. Mashima, H. and Matsumura, M.: Roles of external ions in the excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle. *Jpn. J. Physiol.* **12**, 639-653 (1962).
25. 金谷秀秋, 高氏 昌: ラット疲労筋における弛緩因子系について. 札幌医誌 **41**, 81-86 (1972).
26. Sandow, A.: Skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **32**, 87-138 (1970).
27. Bastian, J. and Nakajima, S.: A Na dependent excitation in the transverse tubular system. *Fed. Proc.* **31**, 323 (Abstr.) (1972).
28. Bastian, J. and Nakajima, S.: Action potential in the transverse tubules and its role in the activation of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* **63**, 257-278 (1974).
29. Blinks, J. R., Rüdel, R. and Taylor, S. R.: Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: Detection with aequorin. *J. Physiol.* **277**, 291-323 (1978).
30. Hodgkin, A. L. and Horowicz, P.: Potassium contracture in single muscle fibres. *J. Physiol.*

- 153, 386-403 (1960).
31. Lüttgau, H. C.: The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **168**, 679-697 (1963).
32. 太田 勲, 小坂 功, 永井 格: カエル速筋線維のカリウム拘縮に対する閾下濃度の K による conditioning の影響ならびに inactivation に対するカルシウムの影響 (未発表).
33. Kosaka, I. and Nagai, T.: Inactivation and restoration in potassium contractures of frog single twitch muscle fibers (to be published).
34. Caputo, C.: The effect of low temperature on the excitation-contraction coupling phenomena of frog single muscle fibres. *J. Physiol.* **223**, 461-482 (1972).